

PRV

PATENT- OCH REGISTRERINGSVERKET

Patentavdelningen

SE 98 / 11468

SE 98 / 11468

REC D 03 SEP 1998

WIPO PCT

Intyg
Certificate

09/673964



Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.

(71) Sökande Mikael Kubista, Mölnlycke SE
Applicant (s)

11/11

(21) Patentansökningsnummer 9801420-2
Patent application number

(86) Ingivningsdatum 1998-04-22
Date of filing

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Stockholm, 1998-08-26

För Patent- och registreringsverket
For the Patent- and Registration Office

Evy Morin

Avgift
Fee

**PATENT- OCH
REGISTRERINGSVERKET
SWEDEN**Postadress/Adress
Box 5055
S-102 42 STOCKHOLMTelefon/Phone
+46 8 782 25 00
Vx 08-782 25 00Telex
17978
PATOREG STelefax
+46 8 666 02 86
08-666 02 86

Mikael Kubista

Page 2

1998 -04- 22

98-04-19

Huvudfaxen Kassa

Metod för karakterisering av enstaka testprover

Den föreliggande uppfinningen tillhör kategorin metoder för karakterisering av prover. Dessa används bl.a. för att undersöka testprover från produktion, patienter eller prover som insamlats på annat sätt.

Uppfinningens bakgrund

När ett prov skall karakteriseras med avseende på dess komponenter separeras i allmänhet först komponenterna från varandra för att senare identifieras och mängdbestämmas separat. Det är dock inte alltid möjligt att separera komponenterna åt, eller så är det av tids/kostnadsskäl inte motiverat. Proverna kan då karakteriseras spektroskopiskt, varvid komponenterna identifieras genom deras unika spektrala responser.

Om man har en uppsättning prover och vet vilka komponenter de innehåller är det i regel trivialt att bestämma deras koncentrationer spektroskopiskt. Detta gäller även om komponenternas spektrala responser överlappar. Om komponenterna däremot är okända är problemet besvärligare. Situationen analyserades första gången i detalj av matematikerna Lawton och Sylvestre (Technometrics, 13, 1971, 617), som visade att det är omöjligt att finna en unik lösning till och med för ett 2-komponentsystem. 1990 utvecklade vi ett experimentellt förfarande som delvis löste detta problem (Kubista, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 7, 273, 1990). Vi visade att om man utförde två spektroskopiska mätningar på varje prov, istället för som tidigare endast en, och mätningarna var sådana att komponenternas bidrag till dessa hade samma intensitetsfördelning, men olika magnitud, så kunde både

Mikael Kubista

Page 3

1998 -04- 22

98-04-19

Huvudfaxen Kassen

komponenternas spektrala responser och koncentrationer bestämmas.

Matematiskt beskrivs dessa mätningarna med ekvationerna:

$$A = CV \text{ eller } a_j(\lambda) = \sum_{i=1}^r c_{ij} v_i(\lambda) \quad j=1,2,\dots,n$$

$$B = CDV \text{ eller } b_j(\lambda) = \sum_{i=1}^r c_{ij} d_j v_i(\lambda) \quad j=1,2,\dots,n$$

där A är en matris som innehåller spektra av det första slaget uppmätta på de n st proverna; B är en matris innehållande spektra av det andra slaget uppmätta på samma n prover; C är en matris innehållande de r olika komponenternas koncentrationer i de n st proverna; V är en matris innehållande normaliserade spektra av de r rena komponenterna; och D är en diagonalmatris vars r diagonalelement är kvoterna mellan komponenternas responser i de två mätningarna. Samtliga spektra är digitaliserade i m punkter. Vi visade att endast utifrån informationen i de uppmätta spektra (A och B) så kunde komponenternas koncentrationer (C), normaliserade spektrala responser (V) samt kvoten mellan deras responser i de två mätningarna (D) bestämmas. Vi beskrev också hur antalet komponenter i proverna (r) kunde uppskattas genom visuell inspektion av de s.k. principalkomponenterna.

I svensk patentansökan 9701132-4 beskrivs ett förfarande att analysera två prover, som kan ha skapats utifrån ett enstaka prov medelst t.ex. extraktion, genom att analysera dem med en teknik som genererar 2-dimensionell respons:

$$I^A(\alpha, \beta) = \sum_{i=1}^r I_i(\alpha) c_i^A I_i(\beta)$$

Mikael Kubista

Page 4

Ink. t. Patent- och reg.verket

98-04-19

1998 -04- 22

Huvudfaxen Kassa

$$I^B(\alpha, \beta) = \sum_{i=1}^r I_i(\alpha) c_i^B I_i(\beta)$$

där $I^A(\alpha, \beta)$ och $I^B(\alpha, \beta)$ är 2-dimensionella spektra uppmätta på de två proverna, A och B, som funktion av variablerna α och β . r är det totala antalet komponenter i proverna, $I_i(\alpha)$ och $I_i(\beta)$ är komponenternas normaliserade 1-dimensionella responser, och c_i^A och c_i^B är deras koncentrationer.

Experimentet kunde beskrivas med ekvationssystemet:

$$A = X C^A M$$

$$B = X C^B M$$

Där A och B är matriser innehållande de uppmätta spektra, X är en matris innehållande komponenternas normaliserade spektrala responser i den första dimensionen, medan M är en matris innehållande deras normaliserade spektra i den andra dimensionen, och C^A och C^B är diagonalmatriser innehållande deras koncentrationer. Genom att omnormalisera endera X eller M, kunde ekvationssystemet omskrivas till:

$$A = X M$$

$$B = X D M$$

Där D är en diagonalmatris innehållande kvoterna mellan komponenternas koncentrationer ($D = C^B / C^A$). Utifrån A och B kunde X, M och D beräknas med kända metoder (Kubista, Chemometrics and

Intelligent Laboratory Systems, 7, 273, 1990; ^{Huvudförfattaren Kesson} Wilson, Sanches & Kowalski, J. Chemometrics, 3 493, 1989).

En begränsning hos ovanstående metoder är att det minsta antal testprover som kan analyseras är två. De kan inte således inte appliceras på ett enstaka testprov, såvida det inte kan uppdelas i åtminstone två delar med olika relativa komponentkoncentrationer, vilket sällan är trivialt. En spädning t.ex., duger inte, eftersom den vanligen inte ändrar komponenternas relativa koncentrationer.

Den föreliggande uppfinningen är ett förfarande att analysera ett enstaka testprov, utan att använda referenser, på ett sådant sätt att komponenterna kan identifieras.

Beskrivning av figurer

Figur 1 visar emissionsspektra uppmätta med olika excitationsvåglängder med parallell polariserat (överst till vänster) och med vinkelrätt polariserat (överst till höger) ljus. Nederst till vänster visas komponenternas beräknade emissionsspektra och nederst till höger visas komponenternas beräknade excitationsintensiteter.

Kortfattad beskrivning av uppfinningen

Den föreliggande uppfinningen är ett förfarande att karakterisera ett enstaka testprov på ett sådant sätt att dess komponenter kan identifieras, utan att utnyttja referensdata. Förfarandet bygger på följande fyra steg:

1. Testprovet analyseras med en metod som genererar en 3-dimensionell

respons enligt: $I(\alpha, \beta, \gamma) = \sum_{i=1}^r c_i I_i(\alpha) I_i(\beta) I_i(\gamma)$, där r är antalet

komponenter som bidrar till signalen, c_i är komponenternas

Mikael Kubista

Page 6

1998-04-22

98-04-19

Huvudtaxan Kassan

koncentrationer och $I_i(\alpha)$, $I_i(\beta)$ och $I_i(\gamma)$ är deras normaliserade 1-dimensionella responser.

2. Antalet komponenter som proverna innehåller, r , uppskattas.
3. För varje komponent bestäms dess arbiträrt normaliserade 1-dimensionella responser $\tilde{I}_i(\alpha)$, $\tilde{I}_i(\beta)$ och $\tilde{I}_i(\gamma)$.
4. Från dessa kan komponenterna identifieras. Detta gör det i allmänhet möjligt att normalisera komponenternas 1-dimensionella responser och på så vis bestämma deras koncentrationer, c_i .

Detaljerad beskrivning av uppfinningen

Som rubriken antyder är den föreliggande uppfinningen ett förfarande att karakterisera ett enstaka testprov på ett sätt som gör det möjligt att identifiera dess komponenterna utan att behöva använda referensprover. Detta sker genom ett strategiskt upplägg av experimentet, som gör det möjligt att registrera en 3-dimensionell respons som är proportionell mot komponenternas koncentrationer, och bidraget från varje komponent är produkten av dess specifika 1-dimensionella responser:

$$I(\alpha, \beta, \gamma) = \sum_{i=1}^r c_i I_i(\alpha) I_i(\beta) I_i(\gamma)$$

Sådan mätning kan t.ex. utföras med vissa former av fluorescensspektroskopi, t.ex. genom tidsupplöst mätning av emissions/excitationsspektra, dvs signalen registreras som funktion av excitationsvåglängd, emissionsvåglängd och tid:

$$I(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, t) = \sum_{i=1}^r c_i I_i(\lambda_{ex}) I_i(\lambda_{em}) I_i(t)$$

I dessa fall är det ofta lämpligt att sammanföra komponentkoncentrationerna c_i och tidsavklingningarna till en tidsberoende koncentration:

Mikael Kubista

Page 7

Ink. t. Patent- och reg.verket

98-04-19

1998 -04- 22

Huvudföreläsningen

$$I(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, t) = \sum_{i=1}^r c_i(t) I_i(\lambda_{ex}) I_i(\lambda_{em})$$

Tiden kan vara tid efter ljuspuls (varvid $c_i(t)$ är proportionellt mot fluorescensavklingningen), tid efter blandning i t.ex. stop-flow experiment (varvid $c_i(t)$ är variationen hos komponent i:s koncentration med tiden), tid efter behandling, såsom fotobleaching (selektiv destruktion av vissa komponenter med ljus), kromatografisk eller annan form av separation, etc. Vid analys av dylika data beräknas komponenternas koncentrationsvariationer samt deras excitations- och emissionsspektra. Det är intressant att notera att intermediära komponenter, som varken är närvarande i början ($c_i(0) = 0$) eller i slutet ($c_i(\infty) = 0$) av experimentet, kan identifieras utifrån dess beräknade spektra.

Det är också möjligt att variera ljusets polarisation:

$$I(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, \alpha) = \sum_{i=1}^r c_i I_i(\lambda_{ex}) I_i(\lambda_{em}) I_i(\alpha)$$

eller, om fasmodulerat ljus används, modulationens frekvens:

$$I(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, \nu) = \sum_{i=1}^r c_i I_i(\lambda_{ex}) I_i(\lambda_{em}) I_i(\nu)$$

osv.

Det är också möjligt att variera yttre parametrar som påverkar komponenterna koncentrationer, såsom temperatur (tryck, volym, etc):

$$I(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, T) = \sum_{i=1}^r c_i(T) I_i(\lambda_{ex}) I_i(\lambda_{em})$$

eller yttre parametrar som påverkar intensiteten i komponenternas responser, såsom externa magnetfält (elektriska fält, etc)

Mikael Kubista

Page 8

Ink. t. Patent- och reg.verket

98-04-19

$$I(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, M) = \sum_{i=1}^I c_i I_i(\lambda_{ex}) I_i(\lambda_{em}) I_i(M).$$

1998 -04- 22

Huvudmann Kassen /

Den spektroskopiska tekniken behöver naturligtvis inte vara fluorescens. Förfarandet kan utföras med de flesta tekniker som genererar 3-dimensionella responser, t.ex. kärnmagnetisk resonans (nmr), masspektrometri etc. Den kan även utföras med de flesta tekniker som genererar en 2-dimensionell responser om komponenternas responser påverkas externa parametrar. Slutligen kan förfarandet även användas med en teknik som genererar 1-dimensionell respons, men då krävs att man samtidigt varierar två olika externa parametrar och att dessas inverkan på komponenternas responser är oberoende så att deras bidrag kan faktoriseras.

Uppfinningen kräver att åtminstone två data punkter bestäms i var och en av de 3 dimensionerna, dvs:

$I_i(\alpha)$ där $\alpha_1, \alpha_2 \dots \alpha_n$ $n \geq 2$

$I_i(\beta)$ där $\beta_1, \beta_2 \dots \beta_m$ $m \geq 2$

$I_i(\gamma)$ där $\gamma_1, \gamma_2 \dots \gamma_l$ $n \geq 2$

Att enbart bestämma två datapunkter i samtliga dimensioner är dock sällan meningsfullt, eftersom noggrannheten i de beräknade responserna är då i regel otillräcklig för att komponenterna ska kunna identifieras.

Däremot går det utmärkt att endast ha två datapunkter i en av dimensionerna, t.ex. $l=2$ (och $m \gg 2$ och $n \gg 2$). Det har dessutom fördelen att den numeriska behandlingen av data underlättas, eftersom komponenternas responser kan beräknas med snabba algoritmer såsom Procrustes rotation och GRAM (Kubista, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 7, 273, 1990; Wilson, Sanches & Kowalski, J.

Huvudföreläsaren Kasser

Chemometrics, 3 493, 1989). I det generella fallet när samtliga l , n och m är större än 2, är lösningsförfarandet mer komplicerat och därmed betydligt mer tidskrävande (Liwo et al., Computers Chem. 89-96, 21, 1997). Dessutom, är det ofta aktuellt att utföra experiment så att endera m och n är betydligt större än den andra. Skälet är att det i regel är tillräckligt för komponenternas identifiering, att med hög noggrannhet bestämma en utav deras 1-dimensionella responser. Detta är t.ex. fallet i exempel 1, där endast komponenternas emissionsresponser bestäms med hög noggrannhet.

Uppfinningen är inte begränsad till mätningar som genererar 3-dimensionell respons, utan även högre ordningens responser kan användas. Generellt gäller att responsen skall vara linjär och bidraget från varje komponent skall vara produkten av dess 1-dimensionella responser:

$$I(\alpha, \beta, \gamma, \delta, \dots) = \sum_{i=1}^I c_i I_i(\alpha) I_i(\beta) I_i(\gamma) I_i(\delta) \dots$$

Naturligtvis, ju högre dimensionen är ju mer tidskrävande blir den numeriska behandlingen av mätdata. Dock, med tanke på den mycket snabba utveckling som sker inom dataområdet, kommer detta knappast vara en praktisk begränsning i framtiden.

Exempel

Uppfinningen illustreras med ett exempel där ett prov karakteriseras fluorescensspektroskopi där excitationsvåglängd, emissionsvåglängd och ljusets polarisation varieras (Figur 1). Detta ger upphov till ett 3-dimensionellt spektrum enligt:

$$I(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, \alpha) = \sum_{i=1}^I c_i I_i(\lambda_{ex}) I_i(\lambda_{em}) I_i(\alpha)$$

Mikael Kubista

Page 10

1998 -04- 2 2

98-04-19

Huvudföreläsningen

I exemplet används 650 olika emissionsvåglängder (m), 11 olika excitationsvåglängder (n) och 2 olika polarisationer ($\alpha = 0^\circ$ benämnt parallell polarisation och $\alpha = 90^\circ$ benämnt vinkelrätt polarisation, l). Från den uppmätta responsen, $I(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, \alpha)$, uppskattades först antalet komponenter (r) till 2 (med statistiskt test och visuell inspektion av principalkomponenterna). Sedan beräknades de komponentspecifika responserna. För detta utnyttjade man det faktum att endast två datapunkter registrerats i en av dimensionerna (polarisation), och skrev om den 3-dimensionella responsen till 2 st 2-dimensionella responser:

$$I(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, \alpha = 0^\circ) = \sum_{i=1}^r c_i I_i(\lambda_{ex}) I_i(\lambda_{em}) I_i(\alpha = 0^\circ)$$

$$I(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, \alpha = 90^\circ) = \sum_{i=1}^r c_i I_i(\lambda_{ex}) I_i(\lambda_{em}) I_i(\alpha = 90^\circ)$$

Dessa kan beskrivas med ekvationssystemet:

$$I^0 = X \alpha^0 M$$

$$I^{90} = X \alpha^{90} M$$

som kan lösas med Procrustes rotation (Kubista, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 7, 273, 1990). Detta gav komponenternas normaliserade excitationsintensiteter som matris $X (\tilde{I}_i(\lambda_{ex}))$, visas nederst till höger i figur 1), komponenternas normaliserade emissionsintensiteter som matris $M (\tilde{I}_i(\lambda_{em}))$, visas nederst till vänster i figur 1), samt kvoterna mellan komponenterna responser av ljus med olika polarisation $(\tilde{I}_1(\alpha = 90^\circ)/\tilde{I}_1(\alpha = 0^\circ)) = 0.25$ och $(\tilde{I}_2(\alpha = 90^\circ)/\tilde{I}_2(\alpha = 0^\circ)) = 0.94$. Från de beräknade komponentspecifika responserna, särskilt emissionsspektra, kunde komponenterna identifieras som p-bis[2-(5-phenyloxazolyl)] benzen (POPOP) och antracen. Slutligen, genom att jämföra med standardspektra av POPOP och antracen, kunde koncentrationerna uppskattas till någon mikromolar.

Patentkrav

1. Ett förfarande att karakterisera testprover som kännetecknas av att:

- a) Provet karakteriseras med en teknik som genererar en multidimensionell respons enligt:

$$I(\alpha, \beta, \gamma, \delta, \dots) = \sum_{i=1}^r c_i I_i(\alpha) I_i(\beta) I_i(\gamma) I_i(\delta) \dots,$$

- b) den uppmätta responsen bryts ned till ett ortogonalt basset, t.ex. med principalkomponentuppdelning,
- c) antalet komponenter i provet (r) uppskattas,
- d) komponenternas 1-dimensionella arbiträrt normaliserade responser beräknas.
2. Ett förfarande enligt krav 1 där provet analyseras med en teknik som genererar 3-dimensionell respons.
3. Ett förfarande enligt något av kraven 1 eller 2 där mer än två datapunkter registreras i endast två av dimensionerna.
4. Ett förfarande enligt någon av kraven 1 till 3 där metoden som genererar den multidimensionell responsen är fluorescens eller kärnmagnetisk resonans.
5. Ett förfarande enligt något av kraven 1 till 4 där variationerna utmed, åtminstone en av dimensionerna, åstadkoms genom att variera en extern parameter, såsom tid, elektriskt eller magnetiskt fält, temperatur, modulation, polarisation.
6. Ett förfarande enligt något av kraven 4 och 5 att karakterisera ett testprov genom att analysera tidsberoende emissions/excitationsspektra, där tiden avser endera utav tid efter excitation, tid efter komponenternas blandande och tid som komponenterna utsatts för behandling såsom kromatografisk separation etc.

Mikael Kubista

Page 12

1998 -04- 2 2

98-04-19

Huvudmannen Kassa

7. Ett förfarande enligt något av kraven 4 och 5 att karakterisera ett testprov genom att analysera två tidsberoenden, i kombination med åtminstone något annat beroende, såsom ljusets våglängd, där de två tidsberoenden avser två utav tid efter excitation, tid efter komponenternas blandande och tid som komponenterna utsatts för behandling såsom kromatografisk separation etc.

Ink. t. Patent- och reg.verket

1998 -04- 22

Huvudföres Kassa /

Sammanfattning

Uppfinningen är ett förfarande att karakterisera enskilda testprover med tekniker som genererar 3-dimensionella responser från vilka provets komponenter kan identifieras. Förfarandet kräver inga referenser.

013/014

Ink. t. Patent- och reg.verket

1998 -04- 22

Huvudföretagen Kassa

